

学校编码: 10384
学 号: 20120051302032

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

番荔枝内生真菌的分离、鉴定、活性筛选
及次级代谢产物的初步研究

**Endophytic fungi from *Annona squamosa* L.:
Isolation, Identification, Bioactivity and Preliminary
Study on the Secondary Metabolites**

林筱

指导教师姓名:	黄耀坚 教授
申请学位级别:	硕 士
专 业 名 称:	微生物学
论文提交日期:	2008- -
论文答辩日期:	2008- -
学位授予单位:	厦门大学
学位授予日期:	

答辩委员会主席: 沈月毛 教授
评 阅 人:

2008 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
前 言.....	1
一、植物内生真菌及其次级代谢产物.....	1
1. 植物内生真菌.....	1
2. 植物内生真菌的次级代谢产物.....	2
2.1 抗菌活性物质.....	2
2.2 抗肿瘤活性物质.....	4
2.3 杀虫活性物质.....	5
2.4 其他活性物质.....	6
2.4.1 抗疟疾物质.....	6
2.4.2 抗氧化物质.....	6
2.4.3 非肽类胰岛素功能类似物.....	7
二、番荔枝及其植物活性成分.....	8
1. 番荔枝内酯.....	9
2. 多氧环己烯.....	9
3. 苯乙烯内酯.....	10
三、真菌聚酮合酶基因.....	11
四、拟茎点霉次级代谢产物.....	12
五、炭团菌属次级代谢产物.....	16
六、本课题研究的目的、内容和意义.....	18
材料与方法.....	20
一、材 料.....	20
二、方 法.....	25
结果与分析.....	37
一、番荔枝内生真菌的分离.....	37

二、番荔枝内生真菌的活性筛选	38
1. 抗菌活性的测定	38
2. 抗氧化活性的测定	40
3. 胰蛋白酶抑制活性和乙酰胆碱酯酶抑制活性的测定	41
4. 抗卤虫活性的测定	41
5. 抗肿瘤活性的测定	42
三、番荔枝内生真菌活性菌株的分类	44
1. 番荔枝内生真菌活性菌株的分类鉴定	44
2. 番荔枝内生真菌活性菌株的系统发育树	47
四、番荔枝内生真菌活性菌株 PKS 基因的初步研究	47
五、B27 菌株次级代谢产物的研究	50
1. 番荔枝内生真菌 B27	50
2. 番荔枝内生真菌 B27 的发酵及培养物处理	51
3. 番荔枝内生真菌 B27 的发酵产物的分离纯化	51
3.1 石油醚相次级代谢产物的分离纯化	51
3.2 乙酸乙酯相次级代谢产物的分离纯化	53
3.2.1 EA-G组分的分离纯化	53
3.2.2 EA-H组分的分离纯化	53
3.2.3 EA-I 组分的分离纯化	53
4. 化合物的结构解析	54
4.1 化合物 LX-1	54
4.2 化合物 LX-2	57
4.3 化合物 LX-17	58
4.4 化合物 LX-6	60
4.5 化合物 LX-13	62
六、B38 菌株次级代谢产物的研究	64
1. 番荔枝内生真菌 B38	64
2. 番荔枝内生真菌 B38 的发酵及培养物处理	65
3. 番荔枝内生真菌 B38 的发酵产物的分离纯化	65

3.1 EA-A- #24-37 组分的分离纯化	66
3.1.1 #7-9 (28mg) 的分离纯化	66
3.1.2 #10-14 (40mg) 的分离纯化	66
3.1.3 #18-19 (120mg) 的分离纯化	66
3.2 EA-A- #48-56 (40mg) 的分离纯化	67
4. 化合物 B38-1 的乙酰化及分离纯化	67
5. 化合物结构解析	68
5.1 化合物 B38-3 和 B38-4	68
5.2 化合物 B38-1 和 B38-1(R)	71
5.3 化合物 B38-2	73
5.4 化合物 B38-5	74
七、化合物生物活性的检测	76
讨论与结论	77
一、番荔枝内生真菌生物活性多样性	77
二、番荔枝内生真菌活性菌株多样性	78
三、番荔枝内生真菌活性菌株 PKS 基因多样性	79
四、菌株 B27、B38 的次级代谢产物及其生物活性	80
1. 化合物 LX-1	80
2. 化合物 LX-2 和 LX-17	80
3. 化合物 LX-6	81
4. 化合物 LX-13	81
5. 化合物 B38-3, B38-4, B38-1, B38-2	81
6. 化合物 B38-5	82
五、结论与展望	83
参 考 文 献	85
常用英文缩写	93
致 谢	95
附 录	96

Catalogue

Abstract.....	I
Abstract in English.....	III
Introduction	1
I . The endophytic fungi and their secondary metabolites...	1
1. The endophytic fungi.....	1
2. The secondary metabolites of the endophytic fungi.....	2
2.1 Compounds of antimicrobial.....	2
2.2 Compounds of antitumor.....	4
2.3 Compounds with insecticidal activity.....	5
2.4 Other bioactive compounds.....	6
2.4.1 Compounds of antimalarial.....	6
2.4.2 Compounds of antioxidation.....	6
2.4.3 Compounds of antidiabetic activity.....	7
II . <i>Annona squamosa</i> and its bioactive compounds.....	8
1. Annonaceous acetogenins.....	9
2. Polyoxy-cyclohexenoids.....	9
3. Styryllactone.....	10
III. The PKS gene of fungi	11
IV. The secondary metabolites of <i>Phomopsis</i> sp.	12
V. The secondary metabolites of <i>Hypoxylon</i> sp.	16
VI. Purpose, contents and significance of this thesis	18
Materials and methods.....	20
I . Materials.....	20
II . Methods.....	25
Results.....	37
I . Isolation for endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>...	37

II. The analysis for bioactivities of the endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	38
1. The analysis for antimicrobial activity.....	38
2. The analysis for anti-oxidation.....	40
3. The analysis for trypsin inhibitory and acetylcholinesterase inhibitory activities.....	41
4. The analysis for brine shrimp inhibitory activity.....	41
5. The analysis for anti-tumor activity.....	42
III. The taxa of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	44
1. The identification of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>	44
2. Phylogenetic tree of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>	47
IV. Study of PKS gene of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	47
V. Study of the secondary metabolites from B27.....	50
1. B27, the endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>	50
2. Cultivation and extraction of fungus B27.....	51
3. Isolation and purification of metabolites.....	51
3.1 Isolation and purification of metabolites from PE extract	51
3.2 Isolation and purification of metabolites from EtOAc extract ...	53
3.2.1 Isolation and purification of EA-G.....	53
3.2.2 Isolation and purification of EA-H.....	53
3.2.3 Isolation and purification of EA-I.....	53
4. The analysis for structures.....	54
4.1 Compound LX-1.....	54
4.2 Compound LX-2.....	57
4.3 Compound LX-17.....	58
4.4 Compound LX-6.....	60
4.5 Compound LX-13.....	62
VI. Study of the secondary metabolites from B38.....	64

1. B38, the endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>	64
2. Cultivation and extraction of fungus B38.....	65
3. Isolation and purification of metabolites.....	65
3.1 Isolation and purification of EA-A- #24-37.....	66
3.1.1 Isolation and purification of #7-9 (28mg).....	66
3.1.2 Isolation and purification of #10-14 (40mg).....	66
3.1.3 Isolation and purification of #18-19 (120mg).....	66
3.2 Isolation and purification of EA-A- #48-56 (40mg).....	67
4. Acetylated B38-1 and the purification of it.....	67
5. The analysis for structures.....	68
5.1 Compound B38-3 and B38-4.....	68
5.2 Compound B38-1 and B38-1(R).....	71
5.3 Compound B38-2.....	73
5.4 Compound B38-5.....	74
VII. The analysis for bioactivities of the compounds.....	76
Discussion and conclusion.....	77
I . The bioactive diversity of the endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	77
II . The biodiversity of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	78
III. The PKS diversity of the bioactive endophytic fungi from <i>Annona squamosa</i>.....	79
IV . The secondary metabolites of B27, B38 and their bioactivities.....	80
1. Compound LX-1.....	80
2. Compound LX-2 and LX-17.....	80
3. Compound LX-6.....	81
4. Compound LX-13.....	81
5. Compound B38-3, B38-4, B38-1, and B38-2.....	81
6. Compound B38-5.....	82
V . Conclusion and expectation.....	83

Feference.....	85
Some English Abbrevation.....	93
Acknowledgements.....	95
Appendix.....	96

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

天然产物是药物的重要来源。从植物内生真菌的次级代谢产物中, 可以分离到许多结构新颖, 生物活性多样的化合物。因此, 药用植物内生真菌的研究, 是发现新药的有效的途径。

本论文于 2005 年至 2006 年不同的季节, 从药用植物番荔枝的叶、枝条、树皮和根部中共分离到 131 株番荔枝内生真菌。

以抗菌模型, 抗肿瘤模型, 抗氧化活性模型, 抗卤虫模型, 胰蛋白酶抑制模型和乙酰胆碱酯酶抑制模型对上述番荔枝内生真菌的发酵提取物进行活性筛选。生物活性测定结果显示, 供测菌株中有 71 株具有一种或者几种生物学活性。其中, 56 株对 5 种指示菌显示出一种或者几种的抗菌活性, 占供测菌株的 42.8%; 33 株显示出对 Raji、Hep G2 细胞的抗肿瘤活性, 占供测菌株的 25.2%; 具有抗氧化、抗卤虫、胰蛋白酶和乙酰胆碱酯酶抑制活性的菌株分别为 20 株、25 株、7 株和 0 株, 分别占供测菌株的 15.3%、19.1%、5.3%和 0.0%。

通过 ITS rDNA 的分析, 对 63 株番荔枝内生真菌活性菌株进行了分子鉴定, 结果表明 63 株活性菌株至少分布于 19 个属中。其中镰刀菌, *Diaporthe*, 拟茎点霉和曲霉是番荔枝内生真菌活性菌株的优势属, 分别占番荔枝内生真菌活性菌株的 23.8%, 15.9%, 12.7% 和 7.9%。系统发育树显示, 除菌株 A10、A26 属于担子菌门 (Basidiomycota), 其余的菌株分属于子囊菌门的 9 个目中, 包括了 Botryosphaerales, 间座菌目 (Diaporthales), 肉座菌目 (Hypocreales), 麦角菌目 (Clavicipitales), 黑痣菌目 (Phyllachorales), 粪壳菌目 (Sordariales), 炭角菌目 (Xylariales), 散囊菌目 (Eurotiales) 和格孢腔菌目 (Pleosporales), 显示出了良好的分类地位多样性。

采用 3 对引物 LC1-LC2c, LC3-LC5c 和 KS3-KS4c 来探讨番荔枝内生真菌聚酮合酶基因多样性。扩增了 63 株生物活性菌株的 KS 结构域。结果 11 株 (17%) 能够被 3 对引物扩增, 产生大小约 700 bp 的扩增产物; 13 株 (21%) 仅能够被 2 对引物扩增; 18 株 (29%) 仅能够被 1 对引物扩增; 而 21 株 (33%) 没有扩增产物。显示了内生真菌聚酮合酶基因的多样性。

对 2 株番荔枝内生真菌活性菌株, B27 (拟茎点霉) 和 B38 (炭团菌) 的次级

代谢产物进行了初步的研究。从菌株 B27 的次级代谢产物中分离并鉴定了 5 个化合物, 包括了一个新化合物 (LX-1), 命名为 phomolide C, 为十元环的大环内酯; 4 个已知结构的化合物 (LX-2, LX-17, LX-6, LX-13), 分别为 1-甲氧基-8-羟基-9,10-蒽醌, 1,8-二羟基蒽醌, cytosporone C, Altioxin A。从菌株 B38 的次级代谢产物中也分离 5 个已知结构的化合物 (B38-3, B38-4, B38-1, B38-2, B38-5), 分别为 Lachnellin C, Lachnellin B, Lachnellin D, Dienetriol 9, 1,3-Benzodioxol-5-ylmethanol。对分离到的 10 个化合物的抗菌活性及抗肿瘤活性进行了研究。上述的 10 个化合物在每片滤纸片含有 50 μ g 样品 (滤纸片法) 时没有显示出抗菌 (5 种指示菌) 活性; 抗肿瘤实验结果显示, 浓度为 50 μ g/mL 时, 仅化合物 LX-1, B38-4 对 HeLa 细胞有微弱的抑制活性, IC₅₀ 分别为 42 μ g/mL 和 49 μ g/mL。

关键词: 番荔枝; 植物内生真菌; 生物活性; 次级代谢产物

Abstract

The nature products were the important source of the medicine. From the secondary metabolites of the endophytic fungi, a lot of compounds with new structures and great bioactive diversities could be found. So the study of endophytic fungi from some pharmaceutical plant was the effective method of the development of medicine finding.

From the leaves, twigs, barks and roots of the medicinal plant *Annona squamosa*, 131 endophytic fungi were isolated in different seasons from 2005 to 2006.

Crude fermentation extraction of each strain was tested by six different bioactive screening programs including anti-microbial activity, anti-tumor activity, anti-oxidation activity, brine shrimp inhibitory activity, trypsin inhibitory activity and acetylcholinesterase inhibitory activity. The result of the bioactive tests showed that 71 strains of the endophytic fungi displayed one or more than one bioactivities. 56 strains (42.8%) displayed anti-microbial activities on one or more than one of 5 indicator organisms. 33 strains (25.2%) displayed anti-tumor activity on Raji, Hep G2 cells. The strains with anti-oxidation activity, brine shrimp inhibitory activity, trypsin inhibitory activity and acetylcholinesterase inhibitory activity were 20 (15.3%), 25 (19.1%), 7 (5.3%) and 0 (0.0%), respectively.

The identification of 63 bioactive endophytic fungi by ITS rDNA assay indicated that the strains were distributed in at least 19 genera and a lot of the strains were *Fusarium* spp. (23.8%), *Diaporthe* spp. (15.9%), *Phomopsis* spp. (12.7%) and *Aspergillus* spp. (7.9%). Phylogenetic relationship of bioactive fungi isolated from *Annona squamosa* indicated that A10 and A26 were distributed in *Basidiomycota* and the other strains were distributed in 9 orders of *Ascomycota*, including *Botryosphaerales*, *Diaporthales*, *Hypocreales*, *Clavicipitales*, *Phyllachorales*, *Sordariales*, *Xylariales*, *Eurotiales* and

Pleosporales. The result of test showed great diversity of taxa.

The diversity of polyketide synthase (PKS) gene was investigated using three pairs of primers, LC1-LC2c, LC3-LC5c, KS3-KS4c. The KS domain of 63 bioactive fungi was amplified. 11 strains (17%) of them can be amplified and amplification products displayed 700bp DNA bands by 3 pairs of primers, 13 strains (21%) by 2 pairs of primers, 18 strains (29%) by only 1 pair of primers and 21 strains (33%) had none amplified product. The result showed the diversity of the PKS gene of these 63 endophytic fungi.

Two bioactive endophytic fungi isolated from *Annona squamosa*, B27 (*Phomopsis* sp.) and B38 (*Hypoxylon* sp.), were selected to study their secondary metabolites. 5 compounds were isolated from B27, including one new compound (LX-1), which was ten-membered lactone, namely phomolide C and four known compounds (LX-2, LX-17, LX-6, LX-13), which were 1-methoxy-8-hydroxy-9,10-anthraquinone, 1,8-Dihydroxy-9,10-anthraquinone, cytosporone C and Altiloxin A, respectively. Five known compounds (B38-3, B38-4, B38-1, B38-2, B38-5) were isolated from B38, too, which were Lachnellin C, Lachnellin B, Lachnellin D, Dienetriol 9 and 1,3-Benzodioxol-5-ylmethanol, respectively. In the later investigation of the antimicrobial and antitumor bioactivities, these ten compounds showed no antimicrobial bioactivity at 50 μ g/disk. Only compounds LX-1, B38-4 showed antitumor bioactivity on HeLa cell and their IC₅₀ were 42 μ g/mL and 49 μ g/mL, respectively.

Key words: *Annona squamosa*; endophytic fungi; bioactivity; secondary metabolites.

前言

一、植物内生真菌及其次级代谢产物

1. 植物内生真菌

内生菌 (Endophyte) 的概念最早由 De Bary^[1] 于 1886 年提出的, 是指生活在植物组织内的微生物, 用以区分那些生活在植物表面的表生菌 (Epiphyte)。现在普遍接受内生菌的定义是指生活在植物组织内或生活史中的某一段生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的菌, 包括那些生活史中某一阶段营表面生的腐生菌, 对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原菌 (Latent pathogens) 和菌根菌^[2]。

植物内生真菌则是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌, 不仅包括了互惠共利的和中性的内共生真菌, 也包括了那些潜伏在宿主体内的病原菌, 可通过组织学方法或从经严格表面消毒的植物组织中分离出, 也可从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 来证明其内生^[3]。植物内生真菌研究始于 19 世纪末, Guerin^[4], Hanausek^[5], Nestler^[6] 和 Vogl^[7] 等人先后在几种黑麦草 (*Lolium arvens*, *Lolium linicolum*, *Lolium remotum* 和 *Lolium temulentu*) 中发现了内生真菌。

内生真菌普遍存在于各种陆生和水生植物中, 具有分布广、种类多的特点^[8]。Hyde 等^[9] 对澳大利亚热带地区棕榈树 (*Trachycarpus* sp.) 内生真菌进行了全面研究, 指出从每种棕榈树内平均能分离到约 100 种内生真菌。Petrini (1986) 在对热带、温带和阿尔卑斯山地区的 200 多种植物调查之后发现, 几乎所有生活的植物体内均有内生真菌的存在^[10]。植物内生真菌主要分布于植物的叶鞘、种子、花、茎、叶片和根等细胞间, 多数情况下, 在叶鞘和种子中分布量最多, 而叶片和根含量极微^[11], 主要通过菌丝生长进入子房和胚珠, 经寄主植物种子传播, 或产生孢子, 通过风、降水等途径传播^[10]。

现今发现的内生真菌主要属于子囊菌 (*Ascomycetes*) 和半知菌 (*Deuteromycetes*), 少数为担子菌 (*Basidiomycetes*), 包括核菌纲 (*Pyrenomycetes*), 盘菌纲 (*Discomycetes*) 和腔菌纲 (*Loculoascomycetes*),

也有报道^[12]:从植物体内分离到了接合菌 (*Zygomycetes*)。其中在多种植物中广泛分布的几个属是: 半壳霉属 (*Leptostroma*), *Cryptocline* 属, 拟隐孢霉属 (*Ctyptosporipsis*), 拟茎点霉属 (*Phomopsis*) 和叶点霉属 (*Phyllosticta*), 其宿主范围涉及藻类、针叶树、灌木和草本等多个植物类群, 但禾本科植物尤为常见^[12]。

2. 植物内生真菌的次级代谢产物

内生真菌能增强宿主的抗逆性, 主要就是通过内生真菌产生各种不同的生物活性物质来实现的, 这些活性物质对于药物开发来说, 具有巨大的应用价值^[13-16]。

2.1 抗菌活性物质

6-Isoprenylindole-3-carboxylic acid (图1) 是一种吲哚类生物碱, 其对革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 和革兰氏阴性细菌假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 均具有抑制作用。此外, 该化合物对一些植物病原真菌, 如辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*)、禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 和禾顶囊壳小麦变种 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) 有抑制活性^[17]。

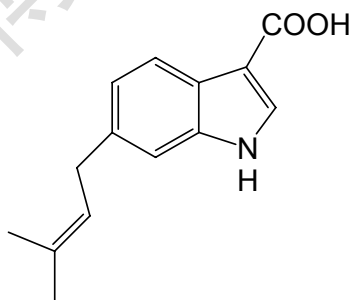


图1 化合物6-Isoprenylindole-3-carboxylic acid的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of 6-Isoprenylindole-3-carboxylic acid

资料来源: 曹晓冬, 周立刚, 李 端, 徐利剑. 植物内生真菌产生生物活性物质的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33: 201-208.

化合物 Enfumafungin 是一种三萜糖苷 (图2), 来自刺柏 *Juniperus formosana* Hayata 的内生真菌 *Hormonema* sp.。该化合物对念珠菌属和曲霉属的真菌具有强的抑制活性, 体内实验显示对播散性念珠菌病模型小鼠有效。此

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库